

12

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**

21 Application number: **86309709.3**

51 Int. Cl.<sup>4</sup>: **G 01 N 33/543**  
**// C12M1/40, G01N33/52**

22 Date of filing: **12.12.86**

30 Priority: **13.12.85 GB 8530715**

43 Date of publication of application:  
**24.06.87 Bulletin 87/26**

64 Designated Contracting States:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI NL SE**

71 Applicant: **UNILEVER PLC**  
**Unilever House Blackfriars P.O. Box 68**  
**London EC4P 4BQ (GB)**

64 Designated Contracting States: **GB**

71 Applicant: **UNILEVER NV**  
**Burgemeester s'Jacobsplein 1 P.O. Box 780**  
**NL-3000 DK Rotterdam (NL)**

64 Designated Contracting States:  
**BE CH DE ES FR GR IT LI NL SE AT**

72 Inventor: **Bosley, John Anthony**  
**10 Philip Way Higham Ferrers**  
**Wellingborough Northamptonshire (GB)**

**Davis, Paul James**  
**The Hawthorns Pavenham Road**  
**Felmersham Bedfordshire MK 3 7EX (GB)**

**Shanks, Ian Alexander**  
**Flintwood Cottage Channer Drive**  
**Penn Bucks HP10 8AQ (GB)**

**Smith, Alan Martin**  
**Littlebrook 92B Village Road**  
**Bromham Bedford MK43 8HU (GB)**

74 Representative: **Stancilffe, Terence Christopher et al**  
**UNILEVER PLC Patents Division P.O. Box 68 Unilever**  
**House**  
**London EC4P 4BQ (GB)**

64 **Materials and methods for microchemical testing.**

57 Apparatus for carrying out a microchemical test, comprising a solid substrate having a surface which carries a polymer hydrogel formed in situ thereon and covalently bonded thereto, for example with the gel in contact with a metal conferring microchemical analytical specificity on the apparatus, e.g. an immunological reactant or an electrode. For example, such a gel in a layer carried within a capillary-fill cell can be used for optical immunoassay.

**EP 0 226 470 A2**

## Description

Materials and Methods for Microchemical Testing

This invention relates to materials and methods for microchemical testing, including specific binding assays including immunoassays (all of which specific binding assays are generally referred to herein as immunoassays).

Among relevant prior art methods of microchemical testing are large numbers of forms of immunoassay, including for example separation assays based on the use of solids carrying immunosorbent sensitisation, and a number of electrochemical test methods based on chemically sensitive transistors and other semiconductor devices, and other semiconductor devices, and chemically selective electrodes. Sometimes the use of immunological sensitisation has been combined with electrochemical methods of detection.

The prior art includes several techniques in which there is involved a coating, especially an envelopment, of glass beads or similar substrates, with a polymeric material, possibly including an immuno-reactant.

USP 4 478 946 (S.A. Inventions Devel.Corp.) and USP 4 352 884 (Kuraray) are both of this class, and both disclose cross-linking in-situ of polymer layers formed by coating a substrate with polymeric material.

GB 2 146 029 (Ramot University) is representative of techniques for making enzyme electrodes coated with acrylic polymers containing enzymes: these also are treated to cross-linking in situ after formation of a polymer coat.

USP 4 198 389 (Hoffmann-la Roche) discloses the use, in connection with alternating-currents and immuno-analysis methods based on electromobility, of various gels carried on solid supports, and containing immunologically active materials.

USP 4 360 358 (Sharma) discloses immunoassays using solid phase substrates coated with dried layers of organic polymer, containing immunologically active material.

USP 4 048 298 (Rohm & Haas) discloses insolubilisation or immobilisation of antibody to a solid phase by polymerisation with aldehyde or alkyl haloformate, or physical entrapment in an insoluble gel polymer or by covalent coupling or adsorption to water-insoluble polymer.

GB 2 046 448 (NRDC) discloses ion-selective electrodes having sensitised polymer membranes separating different liquid electrolytes.

USP 4 298 687 (Maes) discloses the use of sensitised polyacrylamide gels as solid phase in immunoassay.

USP 4 245 016 and 4 298 667 (GEC) describe coated electrodes and separators coated with acrylic copolymers.

USA 4 259 223 (Cal.Inst.Tech.) describes polymeric microspheres carrying surface activation and forming a film coating over porous glass particles.

USP 4 415 666 (Miles) describes electrochemical analysis multilayer membranes made by casting

cellulose acetate compositions.

GB 2 119 162 (UKAEA) describes solid-state electrochemical cells containing solid electrolytes incorporating anionic acrylic polymer.

As seen from representative examples cited above, the prior art includes a large number of methods of providing immunological sensitisation of solid materials. Some have been used in commercial practice. In many cases, however, their manufacture is difficult to carry out while providing acceptable stability and reproducibility of the resulting materials.

We have found that with prior techniques it is difficult to produce uniform polymer or uniform polymer activation.

Accordingly, it is an aim of this invention to produce microchemical analytical apparatus comprising polymer layers, using techniques which can provide improved uniformity in the polymer layers.

A further aim of the invention is to facilitate production of polymer hydrogel layers with high standards of optical uniformity for the purpose of optical techniques of microchemical analysis including immunoassay.

It is one aim of this invention to provide immunologically sensitised solid materials and methods for their manufacture in a way that broadens the effective range of manufacturing techniques available to solve any given analytical problem, and to provide stable and storable compositions which can be conveniently and reproducibly manufactured.

Another aim of the invention is to provide new and useful composites for use in connexion with electrochemical testing.

According to an aspect of the invention we provide apparatus and compositions for carrying out immunological and other microchemical tests, comprising a solid substrate to which is fixed a gel, especially e.g. a hydrogel polymer, which either carries immunological sensitisation or is physically associated with some other material conferring microchemical analytical specificity, e.g. an electroactive membrane and/or chemically selective electrode.

According to the invention we also provide apparatus for carrying out a microchemical test, comprising a solid substrate having a surface which carries a polymer hydrogel formed in situ thereon and covalently bonded thereto. In such apparatus, the gel can be in contact with a material conferring microchemical analytical specificity on said apparatus. For example, the gel can carry an immunological reagent which is a ligand or a binding agent therefor. In certain embodiments, incorporating crosslinked gel, said ligand or binding agent can be a macromolecule occluded within the gel. Alternatively, the ligand or binding agent can be covalently bonded to said gel.

The substrate used in this invention can be for example a siliceous substrate surface-coated with an organic trialkoxy silane derivative which carries an organic functional group conjugated with a mer of

the polymer hydrogel.

The polymer hydrogel can be for example a cross-linked acrylic polymer hydrogel covalently linked to said surface by polymerisation in situ via residues of said organic trialkoxysilane carrying residues of amino-alkyl or epoxyalkyl or acryloyl groups, and optionally carrying organic functional groups derived from comonomers which are copolymerisable with acrylic monomers and which comprise N-hydroxysuccinimidyl, hydroxyethyl, carboxyl or aldehyde groups.

In certain embodiments, the solid substrate can be a plate carrying a layer of said gel thereon, e.g. on an internal surface of a capillary-fill cell formed by two closely-spaced parallel plates. In certain other embodiments, said surface of said solid substrate carries material in contact with said gel and forming an electrochemical electrode. In yet other embodiments said gel can carry at least one enzyme and at least one ligand or receptor therefor, optionally with a chromogenic or fluorogenic enzyme substrate occluded within said gel.

Also provided by the invention is a process for producing a gel carried on a surface of a solid substrate, which comprises:

(a) activating the surface of the substrate to provide covalently-attached functional groups which are capable of reacting with a polymerising monomer, and

(b) polymerising a polymerisable monomer solution in a layer in contact with said activated surface, thereby to form in situ a layer of polymer gel covalently linked to said surface. In this process, the monomer solution can be an aqueous preparation of polymerisable acrylic monomer, and for example a ligand or specific ligand binding agent can be present in the aqueous monomer preparation.

The solid substrate can be part of a test apparatus of any shape or form, ranging from the simple, e.g. a bead, or end of a handling-piece, or strip of substrate material, to more complex apparatus, such as a cell or wall or cuvette of apparatus to contain assay liquid, or an internal surface of sampler apparatus as described in EP 0 164 180 - WO 85/04255, or of capillary fill cell apparatus as described in European Patent Application No. 85304169.7 (EP 0 171 148), which is incorporated herein by reference. For example, the solid substrate can be a glass or other siliceous or ceramic surface, as of a glass-walled vessel or a silica layer covering a solid material of another composition. Alternatively, the solid substrate can be of plastics material.

In the case of embodiments of the invention comprising electrodes, especially chemically selective electrodes and/or electroactive membrane, other features of construction can be for example as described in European Patent Application No. 85304170.5 (EP 0 170 375) or EP 0 186 286, both of which are incorporated herein by reference.

In particular embodiments, such a glass or siliceous layer can be a very thin layer (e.g. a few microns thick) which has been deposited or grown on a composite structure incorporating an electrode

and/or a semiconductor device such as for example a field-effect transistor, optionally with an electroactive overlayer to impart electrochemical selectivity.

The preferred material for bonding the gel to the solid surface is a superficial layer on the solid surface which has been derived by applying to the solid surface a substituted trialkoxysilane carrying a substituent which can either take part directly in gel formation, e.g. as a polymerisable comonomer group, or else take part indirectly, e.g., after its later substitution with such a polymerisable comonomer group.

The presently preferred compound for this purpose is methacryloyloxypropyltrimethoxysilane (MOPS).

Alternatively, another substituted silane can be used, with a functional group capable of substitution by a polymerisable comonomer. Gamma-aminopropyl trialkoxysilanes and glycidyoxypropyltrialkoxysilanes are suitable examples, and they can be substituted with for example acryloyl halide or acrylamide after application to the solid surface.

Silane derivatives can be applied to chemically clean glassy or siliceous surfaces by contact as solutions in an appropriate solvent, for example (dry) toluene at about 70°C for a few hours, or aqueous solution at pH about 3.5 to 3.6, e.g. at about 20°C for a few hours. These examples of conditions are mentioned for illustration and not limitation. The gels to be formed on the solid surfaces are preferably gels based on acrylic monomer units, especially acrylamide and hydroxyethyl methacrylate, including a proportion of cross-linker. Any monomers that can copolymerise with such acrylic monomers can be a usable comonomer unit for this purpose. Preferred comonomers are acrylamide as the base and methylenebisacrylamide as crosslinker. The proportion of cross-linking is chosen to give a desired degree of porosity to the gels, and may be very low (e.g. of the order of about 0.0015% to 0.025% by mole), if the desired degree of porosity is to be such as will allow the entry by diffusion of large molecules such as proteins; or somewhat higher (e.g. of the order of about 0.25% by mole) if the gel should be such as to exclude large proteins such as antibodies.

The gels preferably are formed with substituted functional groups derived for example from functional comonomer derivatives of acrylic acid or acrylamide (including substituted acrylic acids and acrylamides), e.g. from N-hydroxysuccinimidyl acrylate (NHSA) at up to a few tens of mole %, e.g., 10-20 mole %, or for example from hydroxyethyl methacrylate (HEMA) in similar proportions by mole.

Some useful functional groups can be such as to react directly with proteins, e.g. acrolein as a comonomer which yields aldehyde groups. Others may be such as to require activation after the polymer has formed before they can react with protein, e.g. HEMA or acrylic acid, which provide hydroxy(alkyl) and carboxyl groups respectively.

The use of NHSA to functionalise polyacrylamide gels is known *per se* and is for example described with useful details by R.L. Schnaar and Y.C. Lee in *Biochemistry* (1975), 14(7) pp 1535-1541.

Other derivatisation procedures known per se can be easily adapted for application to the gels discussed herein.

Among alternative substrates on which gels can be fixed to make test materials in accordance with this invention are the following:- an oxidised metal wire or plate, e.g., of oxidised titanium, or oxidised or silica-coated silver, (e.g. a 50-500 nm silver mirror plated on a glass or plastics prism or fibre and covered with a (approx.) 1 nm coating of silica), treated to apply a layer of silane-derived material as described above.

Also usable are plastics substrates. In the case of plastics substrates, the invention includes the use for example of plastics surfaces derivatised to include covalently bonded acryloyl or glycidyl groups, which can be achieved either directly or by the use of intermediately derivatised plastics surfaces (known per se) comprising covalently bonded amino, carboxyl or hydroxyl groups which are then reacted with a functional reagent capable of copolymerising with acrylic monomer, e.g. acryloyl or methacryloyl chloride.

The invention is further illustrated by the following examples.

#### Example 1

A capillary-fill cell can be made in the following way to incorporate a thin layer of gel fixed to a transparent optical flat surface of the cell, the gel carrying covalently bound antibody. The cell can be used to carry out an immunoassay as described below.

The bonding tracks can be applied to the glass either before or after the gel formation, preferably afterwards. The gel-forming material can be applied either continuously or patchwise or in spots or other discrete areas over the surface on which the gel is to form. The bonding tracks may then be applied either over the gel layer or over a part of the surface not carrying gel.

(a) A glass microscope slide (with one end optionally polished to give an optically flat perpendicular end) is cleaned successively with laboratory detergent, hot ammonia/hydrogen peroxide solution, and hot hydrochloric acid/hydrogen peroxide solution. The clean slide is contacted with 2% v/v methacryloyloxypropyltrimethoxysilane (MOPS) (Aldrich Chemical Co.), used as a solution in aqueous medium (4 ml commercially available material dissolved in 1 litre of water containing a small quantity of acetic acid to give a final pH approx. 3.5). This solution is stirred for about 15 minutes until clear. The clean slide is contacted with the solution and shaken for about 90 minutes at room temperature (about 22°C), and the slide is then washed with distilled water and air-dried at room temperature.

(b) The MOPS-treated glass slide is next contacted with an approx. 15-micron-thick layer of activated comonomer solution based on acrylamide with a very low amount of crosslinking methylenebisacrylamide (up to about 0.025% by mole) so that the resulting gel will

have a large pore size into which protein molecules can diffuse. Also included in the comonomer mixture is 10%-20% (by mole) N-hydroxysuccinimidyacrylate as activated monomer which can later be substituted by functional groups such as antibody protein molecules, antigens, or haptens. In alternative and sometimes preferred embodiments, the proportion of crosslinker can be much lower, e.g. 0.0015% by mole.

The activator for polymerising the comonomer mixture is a conventional initiator mixture, e.g. 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, used at a concentration of about 0.12% based on total monomers. A preferred alternative is Irgacure 184 (Trade Mark), (UV photoinitiator), i.e. 1-hydroxycyclohexylphenyl ketone. Initiation is triggered by light or heat. The monomer solutions are all made up in purified water where appropriate, though aqueous buffer can be used if desired, and where NHS acrylate is used, it can be dissolved in acetone, and mixed with aqueous acrylamide to give a final proportion of 5:3 water:acetone, with the initiator dissolved first in whichever ingredient (e.g. acetone) provides greater solubility.

The thickness of the film (in this example, of the order of, e.g. 10 micron thick) can be controlled by adjusting monomer aliquot volumes at a fixed rate of surface area coverage.

The smoothness of the gel layer can (if desired) be further assured by clamping a flat solid surface in the desired spaced relationship to the microscope slide on which the gel layer is to be formed.

It is preferred to make such a top plate specially hydrophobic by coating it with dichlorodimethylsilane or equivalent anti-adhesive material.

(c) After formation of the gel, the gel is reacted for about 16 hours or overnight with aqueous antibody solution, for example, as here, anti-gentamicin antibody, at pH about 6-9, and about 2 mg/ml protein concentration, to allow antibody to diffuse into the gel and become covalently coupled to the gel by substitution of the N-hydroxy-succinimidyl groups. The quantity of active antibody introduced can be measured by conventional means, e.g. by binding of labelled (e.g. radioiodine labelled) antiglobulin. The slide, so provided with antibody-bearing adherent silane-bonded gel layer, is then made up into a capillary-fill cell using the technique of European Patent Application No. 85304169.7 (EP 0 171 148).

(d) Immunoassay is carried out in the cell by introducing a mixture of (i) sample liquid containing an unknown quantity of gentamicin or a calibration standard, and (ii) fluorescent gentamicin (reaction product of gentamicin with FITC) in a standardised quantity suitably related to the quantity of antibody attached to the gel within the cell for the purposes of competitive

immunoassay.

After a suitable reaction period, the fluorescence bound to the gel is measured by a modification of the instrument disclosed in European Patent Application No. 85304172.1 (EP 0 170 376) which is incorporated herein by reference, so that the output signal is taken to be proportional to the light which emerges from the optically flat end of the microscope slide at angles within a marginal range slightly closer to the axis than the innermost angular limit on each side at which most light derived from the bulk of the liquid emerges from the slide. In one example, based on a glass substrate (refractive index about 1.52), aqueous reaction liquid (refractive index about 1.33), and a gel with refractive index about 1.38 when hydrated, the suitable range of angles of exit off the long axis of the slide was found to be within about 39.5° to 47.4° on either side of the axis.

#### Example 2

According to this Example, gel layers of about 30-500 micron in thickness are formed on the surface of one end each of glass slides prepared and treated with MOPS as in Example 1. The gel-forming material is equivalent to that used in Example 1: of European specification No. 85306572.0 (EP 0 178 790), i.e., it includes biotinyl-HEMA comonomer and glucose oxidase for occlusion in the gel. The resultant gel bodies, fixed on the ends of the glass slides as solid substrates, can be used as a convenient material for carrying out assays in ways corresponding to those mentioned and described in European specification No. 85306572.0, (EP 0 178 790), which is incorporated herein by reference.

#### Example 3

A silica-coated glass slide cut from Permabloc float glass (ex Pilkington) and cleaned with laboratory detergent is treated with MOPS in the manner described in Example 1.

The MOPS-treated glass slide is then contacted with an approx. 6 micron thick layer of an active comonomer solution based on 1-vinyl-2-pyrrolidone with a low amount of difunctional ethylene glycol dimethacrylate (for example, 0.5% by mole). The resulting gel has a large pore size into which protein molecular can diffuse. Also included in the comonomer mixture is 10-20 mole % acrolein as active monomer which can later be substituted by functional groups such as antibody protein molecules, antigens, or haptens.

The activator polymerising the comonomer mixture is a conventional photoinitiator, e.g. 1-hydroxycyclohexylphenyl ketone, used at a concentration of approx. 0.35% based on total monomers. Initiation is triggered by long wavelength u.v. light. The monomer solutions may be made up in a solvent, e.g. 1-methyl-2-pyrrolidone, or in purified water, or aqueous buffer.

#### Example 4

In Example 1, the step involving the binding of antibody to active sites within a gel after polymerisation can be made unnecessary by polymerising an aqueous monomer solution that contain antibodies.

For example, a MOPS-treated glass slide described in Example 1 or 3 is contacted with an approx. 6 micron thick layer of an active comonomer solution based on acrylamide. Also included in the comonomer mixture is 10-20 mole % as active monomer and a very small amount of the cross-linking agent N,N'-methylenebisacrylamide (approx. 0.0015 mole %).

The monomers are made up in aqueous buffer solution containing for example rabbit anti-human IgG. The initiation system consists of Quantacure QTX (Tradename, ex Ward Blenkinsop & Co. Ltd) and dimethylaminoethanol. (Quantacure QTX comprises 2-hydroxy-3-(3,4-dimethyl-9-oxo-9H-thioxanthen-2-yloxy)-N,N,N-trimethyl-1-propylammonium chloride). The polymerisation of the comonomer solution is triggered by exposure to visible light from a tungsten lamp. After polymerisation, the gels are washed in phosphate-buffered saline.

#### Example 5

In addition to the use of the active monomers described in Examples 1, 3 and 4, it is also possible to use monomers that may be activated in a separate step following polymerisation.

For example, a MOPS-treated glass slide described in Examples 1 or 3 is contacted with an approx. 6 micron thick layer of an aqueous comonomer solution consisting of acrylamide (49.5 mole %), sodium acrylate (49.5 mole %) and N,N'-methylenebisacrylamide (1 mole %).

The activator polymerising the comonomer mixture is a conventional photoinitiator, e.g. 1-hydroxycyclohexylphenyl ketone, used at a concentration of approx. 0.16 % based on total monomers. Initiation is triggered by long wavelength u.v. light.

Following polymerisation, the carboxyl groups contained within the polymer matrix may be activated by treatment with, for example, an aqueous solution Woodward's Reagent K (N-ethyl-5 phenylisoxazolium-3'-sulphonate). The activated copolymer may then be reacted with functional groups such as antibody protein molecules, antigens, or haptens.

An embodiment of the invention is illustrated for example by the accompanying Figures 1-3 and associated description.

Figure 1 shows a diagrammatic section through a disposable capillary cell device incorporating a gel layer formed according to one embodiment of the invention.

Figure 2 shows a diagrammatic plan of the cell device of Figure 1, and includes a line I-I to show the line of the section of Figure 1.

Figure 3 shows in diagrammatic fragmentary plan an intermediate stage in the manufacture of a plurality of devices as of Figures 1-2.

Figures 1-2 show a capillary cell device of a size to be handled easily, e.g. about 3 cm x 1.5 cm. The device comprises an upper plate 1 and lower

2

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑪ DE 39 19915 A1

⑤1 Int. Cl. 5:  
C07 D 207/452

②1 Aktenzeichen: P 39 19 915.0  
②2 Anmeldetag: 19. 6. 89  
④3 Offenlegungstag: 20. 12. 90

DE 39 19915 A1

⑦1 Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

⑦2 Erfinder:  
Huber, Erasmus, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 8046  
Garching, DE; Klein, Christian, Dipl.-Chem. Dr., 8120  
Weilheim, DE; Batz, Hans-Georg, Dr.rer.nat., 8132  
Tutzing, DE; Zink, Bruno, 8114 Uffing, DE

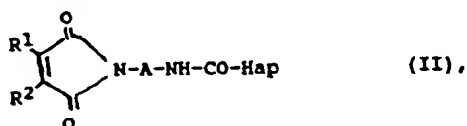
⑤4 Aminoalkylmaleimide und davon abgeleitete Hapten- und Antigenderivate sowie Konjugate mit Peptiden oder Proteinen

Die Erfindung betrifft neue Aminoalkylmaleimide der allgemeinen Formel I



in der R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylgruppe darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte Alkylkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, sowie deren entsprechenden Säureadditionssalze, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminoheptylmaleimid.

Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die aus Verbindungen der allgemeinen Formel I und immunologischen Bindungspartner gebildeten Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II



in der R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> und A die oben angegebenen Bedeutungen

Außerdem betrifft die Erfindung immunologische Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden oder Proteinen hergestellt werden können. Diese Konjugate werden im folgenden synonym als Hapten-Peptid bzw. Hapten-Protein-Konjugate bezeichnet. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und II sowie der Peptid- und Protein-Konjugate, sowie die Verwendung dieser Konjugate in diagnostischen Bestimmungsmethoden, insbesondere in Immunoassays.

E 39 19915 A1

lassen sich vorzugsweise durch den Einsatz von bifunktionellen Reagenzien herstellen.

Ein weiteres Beispiel aus jüngster Zeit ist die auf dem Gebiet der homogenen Immunoassays immer mehr an Bedeutung gewinnende sogenannte CEDIA-Technik (Clinical Chemistry 32/9, 1637 – 1641 (1986); US-47 08 929). Bei dieser diagnostischen Bestimmungsmethode wird ebenfalls von dem Prinzip der Verknüpfung von zwei Verbindungen Gebrauch gemacht. Dabei wird ein Analyt, der im allgemeinen ein Hapten oder ein Antigen sein kann, an eine enzymatisch inaktive Vorläuferstufe des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase angeknüpft. Diese inaktive Vorläuferstufe ist ein Peptid und wird in der oben zitierten Literatur auch als Enzymdonor bezeichnet.

Die Durchführung dieses Tests beruht auf folgendem Prinzip: Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase besteht aus 4 Untereinheiten, die wiederum aus einer größeren Polypeptidkette, die auch als Enzymakzeptor EA bezeichnet wird, und einer kleineren Peptidkette, Enzymdonor ED genannt, aufgebaut ist. Enzymakzeptor und Enzymdonor sind beide enzymatisch inaktiv, können sich aber spontan zu einem aktiven Tetramer zusammenlagern. Aufgrund der außerordentlich geringen Dissoziationskonstanten des aus Enzymdonor und Enzymakzeptor gebildeten aktiven Enzyms ist die Menge des gebildeten Enzyms direkt proportional zur Menge des vorhandenen Enzymdonors bzw. -akzeptors. Bei der Durchführung von Immunoassays macht man sich die Eigenschaft nun dadurch zu Nutzen, in dem man anstelle des natürlichen Enzymdonors einen chemisch modifizierten Enzymdonor einsetzt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, daß ein Analyt oder Immunogen kovalent an funktionelle Gruppen des als Enzymdonor fungierenden Peptids geknüpft ist. Als Immunogen kommen beispielsweise Haptene oder Antigene in Frage.

Bei der Durchführung der immunologischen Bestimmungsmethode ist im Testsystem außerdem ein das entsprechende Immunogen erkennender Antikörper in einer Menge vorhanden, der die spontane Assoziation des Enzymdonors und des Enzymakzeptors zum aktiven Enzym verhindert.

Die Reaktion zur Bestimmung der Konzentration eines dem Immunogen entsprechenden Analyten wird nun derart durchgeführt, daß eine gewisse Menge der zu bestimmenden Probe zu dem oben beschriebenen Testsystem zugefügt wird. Da es sich bei diesem Reaktionstyp um einen kompetitiven Test handelt, binden die vorhandenen Antikörper, die gegen den Analyten oder das Hapten gerichtet sind, sowohl die aus der Probe kommenden freien Antigene oder Haptene, sowie einen Teil der mit dem Antigen oder Hapten markierten Enzymdonatoren. Der durch die Verdrängungsreaktion durch das freie Antigen ausgelöste freie Anteil des markierten Enzymdonors assoziiert dann spontan mit dem Enzymakzeptor zum enzymatisch aktiven Tetramer, dessen Konzentration direkt proportional zu der Konzentration des aus der Probe stammenden Analyten (Antigen) oder Haptens ist. Die Menge des durch diese spontane Assoziation gebildeten Enzyms  $\beta$ -Galactosidase wird durch Hydrolyse eines geeigneten Enzymsubstrates, beispielsweise von o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid oder Chlorphenolrot- $\beta$ -D-galactopyranosid und Freisetzung des entsprechenden Chromophors gemessen.

Bei der oben dargestellten erforderlichen Verknüpfung zwischen Immunogen (Analyt) und Enzymdonor besteht das Problem, daß die Modifizierung des Enzymdonors nur an solchen Stellen im Molekül erfolgen darf, die für die Erkennung zwischen Enzymdonor und Enzymakzeptor nicht von Bedeutung sind. Ansonsten wäre die Assoziation zum enzymatisch aktiven Enzymkomplex gestört und der gemessene Wert für das zu bestimmende Hapten würde ein falsches Ergebnis vortäuschen.

Es ist literaturbekannt, daß zur Herstellung der Hapten-Enzymdonor-Konjugate beispielsweise Maleimidylbenzcarbamyl-digoxigenin als Linker eingesetzt werden kann (Clin.Chem. 32, 1637 (1986)). Die Bindung dieses Haptens an den Enzymdonor erfolgt durch Umsetzung von Digoxigenin, das als Hapten fungiert, mit 3-Maleimidobenzoesäure. Die Verknüpfung seitens des Enzymdonors mit dem oben gebildeten Digoxigenin-Derivates erfolgt durch Reaktion einer Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein am Enzymdonor mit der Maleimido-gruppe.

Das in dem oben genannten Fall eingesetzte bifunktionelle Reagens hat jedoch den Nachteil, daß einerseits die vorhandene Urethan-Bindung hydrolyseempfindlich ist und das Reagenz somit nicht hinreichend stabil genug ist, und daß ferner durch den vorhandenen Benzcarbamylrest ein Teil der Bindungsaktivität der Antikörper gegen den Linker selbst, d. h. gegen das Brückenmolekül zwischen Hapten und Enzymdonor im Immunogen gerichtet ist. Dies bedeutet, daß bei der Antigen-Antikörper-Reaktion häufig mit Kreuzreaktivitäten zu rechnen ist, die im immunologischen Test zu Problemen führen.

Es bestand daher die Aufgabe, solche bifunktionellen Reagenzien zu finden, die sich für die Verknüpfung zwischen Hapten einerseits und Enzymdonor andererseits eignen, wobei die mit Hilfe dieser Linker hergestellten Hapten-Peptid-Konjugate eine möglichst geringe Kreuzreaktivität gegen das Brückenmolekül selbst aufweisen sollen.

Außerdem sollten diese bifunktionellen Reagenzien möglichst stabil und einfach herstellbar sein. Ferner sollen sie mit Haptenen unter chemisch milden Bedingungen reagieren, damit die zur Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern als Immunogene erforderlichen Haptenderivate auf schonende und einfache Weise hergestellt werden können.

Diese Aufgaben werden mit der vorliegenden Erfindung gelöst. Insbesondere hat sich gezeigt, daß die zwischen den Maleimidgruppe und der Aminogruppe sich befindende Alkylgruppe A eine geringere Kreuzreaktivität verursacht als bei den aus dem Stand der Technik bekannten Hapten-Peptid-Konjugaten. Dies trifft insbesondere für die geradkettigen Derivate mit  $n = 2 - 4$  zu.

Gegenstand der Erfindung sind die neuen Verbindungen der allgemeinen Formel I

Verfügung gestellt, in denen das Hapten ein Steroidhormon ist. Der Nachweis von Steroidhormonen, wie z. B. Östrogen, Testosteron, Cortisonen und Herzglucosiden, denen alle das Steroidgrundgerüst gemeinsam ist, spielt in der Diagnostik eine bedeutende Rolle. Die Zurverfügungstellung von Antikörpern gegen Steroidhormone bzw. gegen die entsprechenden Hapten-Peptid-Konjugate für die Durchführung von Immunoassays ist daher wünschenswert.

Es hat sich erwiesen, daß durch die Derivatisierung der Haptene zu den Verbindungen der allgemeinen Formel II das Epitop des Haptens nicht beeinträchtigt wird, so daß ein gegen das jeweilige in der zu bestimmenden Probe vorhandene freie Hapten gerichteter Antikörper auch das entsprechend modifizierte Hapten-Peptid-Konjugat in gleichem Maße erkennt.

Ebenso hat sich gezeigt, daß die derivatisierten Hapten-Peptid-Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der Formel II mit sulfhydrylgruppenhaltigen Peptiden oder Proteinen erhalten werden, ohne weitere Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften mit dem Enzymakzeptor EA zu den Tetramer-Komplexen der  $\beta$ -Galactosidase assoziieren. Diese wiederum zeigen durch die im Prinzip vorhandene Derivatisierung des Enzyms keine nachteilige Beeinflussung der enzymatischen Aktivität, und spalten die in Frage kommenden Substrate in gleicher Weise wie die unmodifizierte  $\beta$ -Galactosidase.

Bei der Verwendung für die Immunisierung werden die Hap-Derivate der allgemeinen Formel II eingesetzt. Das Haptenderivat wird in den zur Antikörperbildung geeigneten Organismus in Abständen mehrmals injiziert. Es kommt dabei zur Bildung von Antikörpern, die in sehr hohem Prozentsatz nun gegen das Hapten gerichtet sind, und keine Kreuzreaktivität mit den Verknüpfungsgruppierungen aufweisen. Die Antikörper werden dann in an sich bekannter Weise aus dem Organismus isoliert und gereinigt. Die erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II eignen sich sowohl zur Immunisierung für die Herstellung polyklonaler Antikörper als auch zur Herstellung monoklonaler Antikörper.

Überraschenderweise gelingt es durch Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II, Antikörper zu erhalten, die sehr wenig Kreuzreaktivität mit der Brückenverbindung aufweisen. Die erhaltenen Antikörper haben eine hohe Affinität zu dem Hapten. Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate zur Immunisierung werden hohe Antikörpertiter erhalten. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugate besonders gut geeignet zum Einsatz in Immunoassays. Da die Antikörper zu dem Brückenmolekül keine oder eine nur sehr geringe Affinität aufweisen und daher das Hapten sehr spezifisch binden, erhält man mit diesen Konjugaten bei der Verwendung in Immunoassays sehr genaue Ergebnisse.

Die erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II besitzen den Vorteil, daß sie einerseits die Struktur des freien Haptens weitgehend unverändert beinhalten, andererseits im Vergleich zu Derivaten, die z. B. aus dem Stand der Technik bekannt sind, im Brückenmolekül eine charakteristische Änderung aufweisen. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate ermöglicht deshalb die Durchführung heterologer Linker-Techniken auf einfache und effektive Weise.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Konjugate, die durch Umsetzung der Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden und Proteinen hergestellt werden können. Als Peptide und Proteine kommen vorzugsweise solche in Frage, die eine Sulfhydrylgruppe bzw. eine Cysteingruppe enthalten, die mit der Maleimidogruppe der Verbindungen der Formel II reagieren. Die Herstellung solcher Derivate erfolgt nach an sich bekannten Methoden der chemischen Modifizierung von Proteinen. Vorzugsweise werden jedoch Peptide, insbesondere die in der oben beschriebenen CEDIA-Technik verwendbaren Enzymdonatoren ED eingesetzt. Die Herstellung verschiedener ED-Derivate ist aus US 47 08 929 bzw. Clin. Chem. 32 (9), 1986, 1637 – 1641 bekannt, bzw. sind bei Microgenics Corp., Concord, California (USA) erhältlich.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugates bei der Durchführung von Immunoassays.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung anhand von konkreten Ausführungsbeispielen:

#### Beispiel 1

##### 2-(N-Maleinimido)ethylamin

12 g (0,2 mol) Ethylendiamin werden in 200 ml Dioxan/Wasser (50/50 v/v) gelöst. Innerhalb von 1,5 h wird unter Rühren und Kühlung im Eisbad eine Lösung von 21,8 g (0,1 mol) Di-tert.-butyl-dicarbonat in 100 ml Dioxan zugetropft. Man läßt 1 h bei Raumtemperatur weiterrühren, dann wird mit 500 ml Wasser verdünnt und mit 1 l Essigester extrahiert. Die organische Lösung wäscht man dreimal mit je 200 ml Wasser und extrahiert mit zweimal je 300 ml 0,1 n HCl. Die vereinigten HCl-Phasen werden mit 2 n NaOH auf pH 10,0 gestellt und mit 600 ml Essigester extrahiert. Die organische Lösung wird nochmals mit 300 ml Wasser gewaschen, mit 20 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingedampft.

Ausbeute: 1,35 g zähes Öl (entspr. 8,4% d.Th. bez. auf Di-tert.-butyl-dicarbonat).

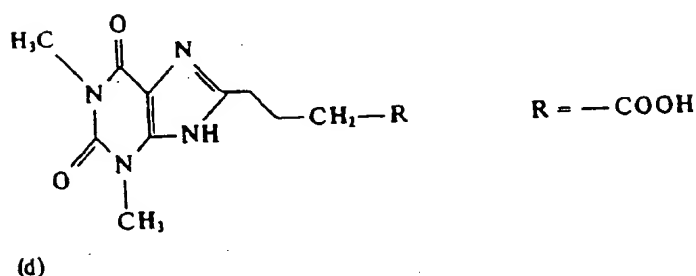
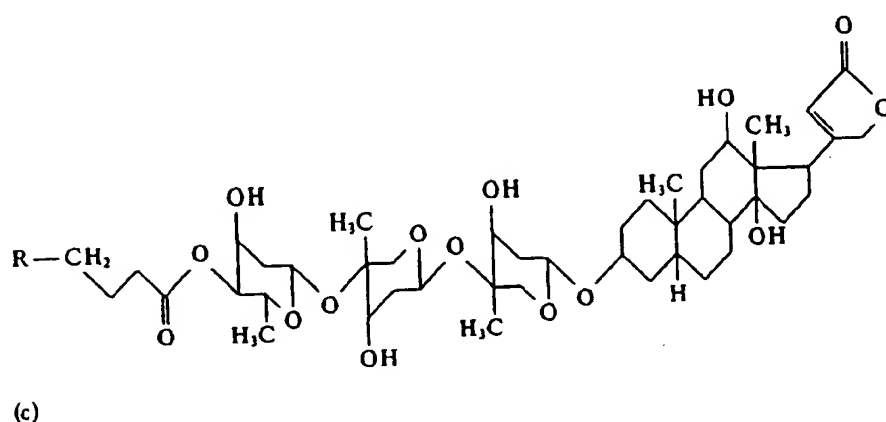
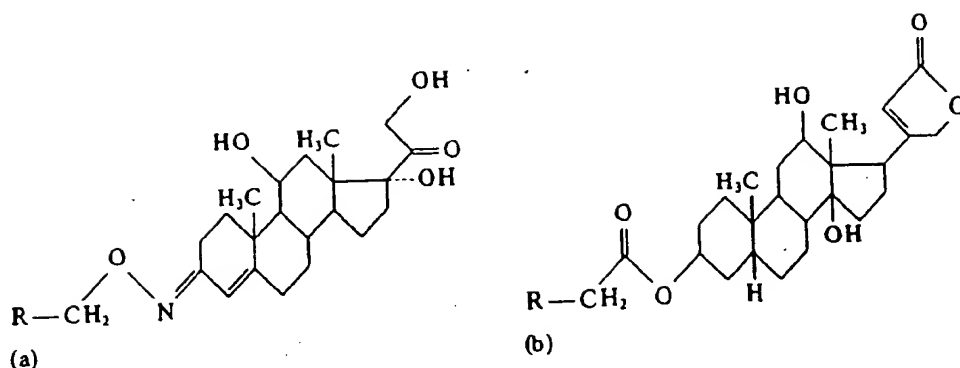
DC: Kieselgel, Methanol/Essigester (66/33 v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt);  $R_f = 0,14$ .

#### Beispiel 2

##### N-(Tert-butyloxycarbonyl)-2-(N-maleinimido)ethylamin

0,8 g (5 mmol) 2-(N-Maleinimido)ethylamin löst man in 25 ml gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung. Die Lösung wird über ein Faltenfilter filtriert und auf 0°C gekühlt. Anschließend gibt man unter Rühren 0,8 g





- a: A. Tsuji, M. Smulowitz, J.S.C. Liang und D.K. Fukushima, Steroids 24 (1974) 739—751.  
 b: G.C. Oliver, B.M. Parker, D.L. Brasfield und C.W. Parker, J. Clin. Invest. 47 (1968) 1035—1042.  
 c: H.-G. Batz, H.-R. Linke, K. Stellner und G. Weimann, DE-A 25 37 129 bzw. US 41 33 949.  
 d: C.E. Kuck, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 13 (1976) 497—505.

0.5 mmol der Hapten-Carbonsäure a—d werden zusammen mit 63 mg (0.55 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 10 ml absolutem DMF gelöst und mit 1.13 mg (0.55 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man läßt 4 h bei Raumtemperatur rühren, filtriert und dampft die Lösung im Vakuum ein. Der Rückstand wird in 20 ml THF aufgenommen und eventuell unlösliche Reste an N,N'-Dicyclohexylharnstoff durch Filtration entfernt. Die Lösungen der Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester werden in dieser Form zur nächsten Stufe eingesetzt.

#### Beispiel 5

#### Hapten-Carbonsäure-[2-(N-maleinimido)ethylamide] II a—d

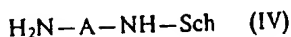
#### Allgemeine Vorschrift

Zur Lösung der aktivierten Haptene aus Beispiel 4 werden 88 mg (0.5 mmol) 2-(N-maleinimido)ethylamin gegeben. Unter Rühren werden 51 mg (0.5 mmol) Triethylamin zugetropft, danach läßt man 6 h bei Raumtemperatur weiterrühren. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft und die Hapten-Maleinimid-Verbindung II A—C durch Säulenchromatographie an einer Kieselgel-Säule (25 × 30 cm) mit einem geeigneten Lösungsmittel gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und im Vakuum eingedampft.

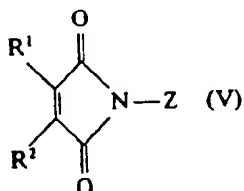
Die Lösung von Verbindungen II D wird im Vakuum auf die Hälfte eingengt und der Niederschlag abfiltriert. Dann wird das Lösungsmittel im Vakuum vollends entfernt. Der Rückstand wird mit Isopropanol digeriert, das

# DE 39 19 915 A1

in der A die oben angegebene Bedeutung hat, in eine Verbindung der allgemeinen Formel IV

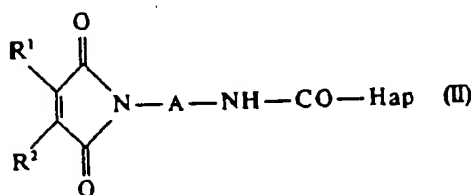


überführt wird, wobei Sch eine für die Aminogruppe geeignete leicht abspaltbare Schutzgruppe, beispielsweise die tert.-Butyloxycarbonylgruppe darstellt, und anschließend die Verbindung der allgemeinen Formel IV mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V



in der R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> die oben angegebenen Bedeutungen haben und Z eine reaktive Gruppe bedeutet, nach an sich bekannten Verfahren umgesetzt, und anschließend die Schutzgruppe Sch wieder abspaltet.

## 5. Amidoalkyl-maleimide der allgemeinen Formel II



in der Hap der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen oder deren reaktiven Derivate tragenden Hapten oder Antigen durch Amidierung gebildete Rest ist, R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich oder verschieden sind und eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylgruppe oder ein Wasserstoffatom bedeuten, und A eine geradkettige oder verzweigte Alkylengruppe mit 2-6 C-Atomen darstellt.

6. Amidoalkyl-maleimide nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten ein Steroidhormon ist.

7. Amidoalkylmaleimide nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten ein Xanthinderivat ist.

8. Amidoalkylmaleimide nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten Cortisol, Testosteron oder Digoxigenin ist.

9. Amidoalkylmaleimide nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten Theophyllin ist.

10. Verfahren zur Herstellung von Amidoalkylmaleimiden der allgemeinen Formel II nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man eine eine oder mehrere Carboxylgruppen oder deren reaktiven Derivate tragendes Hapten oder Antigen mit einer Verbindung der allgemeinen Formel I, wie in den Ansprüchen 1 bis 3 angegeben, in an sich bekannter Weise umsetzt.

11. Konjugate hergestellt durch Umsetzung von Amidoalkylmaleimiden gemäß einem der Ansprüche 5-9 mit einem eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen tragenden Peptid oder Protein.

12. Konjugate nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid der als ED4 bezeichnete Enzymdonor des Enzyms β-Galactasidase ist.

13. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel II gemäß einem der Ansprüche 5 bis 9 mit einem eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen tragenden Peptid auf an sich bekannte Weise umsetzt.

14. Verwendung von Verbindungen nach den Ansprüchen 1 bis 3 zur Herstellung von Verbindungen wie in den Ansprüchen 5 bis 9 angegeben.

15. Verwendung von Verbindungen der Formel II nach einem der Ansprüche 5 bis 9 zur Herstellung von Konjugaten wie in den Ansprüchen 11 oder 12 angegeben.

16. Verwendung von Konjugaten nach den Ansprüchen 11 oder 12 in diagnostischen Bestimmungsverfahren.

17. Diagnostisches Mittel enthaltend Konjugate gemäß Anspruch 11 oder 12 zur Durchführung von immunologischen Bestimmungen.